

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Porovnání výstupů a aplikovatelnosti moderních
fluorescenčních metod při charakterizaci fluorescenčně
značených lipidových vezikul**

**Comparison of outputs and applicability of modern
fluorescence methods when characterising
fluorescently labeled lipid vesicles**

Praha 2009

Marie Kolářová

Ráda bych zde poděkovala svému školiteli Mgr. Aleši Bendovi, Ph.D. za cenné a trpělivé konzultace a rady, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Miroslavu Štěpánkovi, Ph.D. za provedení experimentu rozptylu světla a Doc. Martinu Hofovi, Dr. rer. nat. DSc. za umožnění vypracování této práce v jeho skupině. Poděkování patří též mým rodičům, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

Tato bakalářská práce byla vypracována na Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR pod vedením Mgr. Aleše Bendy, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci napsala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím s případným zapůjčováním této práce.

V Praze dne 3.6.2009

Marie Kolářová

Obsah

1	Úvod a motivace	1
2	Teoretická část	2
2.1	Fluorescence	2
2.2	Fluorofory	3
2.3	Lipidy, vezikuly	4
2.4	Difúze	5
2.5	Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS)	6
2.6	Dvoubarevná fluorescenční kroskorelační spektroskopie (FCCS)	8
2.7	Časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie (FLCS)	9
2.8	Antibunching	10
2.9	Rozptyl světla	11
3	Experimentální část	14
3.1	Experimentální uspořádání	14
3.1.1	Materiály	14
3.1.2	Příprava vezikul	15
3.1.3	Instrumentální nastavení	15
3.2	Výsledky	16
3.2.1	Porovnání velikostí vezikul zjištěných metodami FCS a rozptylem světla	16
3.2.2	Určení počtu fluoroforů na vezikulu metodami FCCS, FLCS a antibunchingu	18
4	Závěr	22
5	Seznam použité literatury	23
6	Seznam zkratk a symbolů	25

1 Úvod a motivace

Při řešení biologických a biochemických problémů se často objevuje otázka, jakou velikost má sledovaný systém, popř. z kolika funkčních jednotek se skládá. Jednou z možností, jak odpovědět na tyto otázky, je použít fluorescenční metody [1]. Z velkého množství možných aplikací lze uvést jako příklad sledování difúze fluorescenčně značeného proteinu, změření jeho difúzního koeficientu a následné určení jeho velikosti. Dalším příkladem je stanovení stupně oligomerizace proteinu, kdy se analýzou fluorescenčního signálu určí počet emiterů na proteinový komplex. Počtu emiterů odpovídá hledaný stupeň oligomerizace. Vzájemnou interakci různých proteinů pak lze sledovat například pomocí kroskorelačních metod.

U nových, do výzkumné praxe teprve nedávno zavedených metod, mezi něž patří i pokročilé fluorescenční metody jako fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) a její modifikace, je třeba nejprve ověřit jejich použitelnost a robustnost na menších a jednodušších modelových systémech a až poté je aplikovat na složité biologické systémy. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli otestovat metodu fluorescenční korelační spektroskopie na modelovém systému jednovrstvých lipidových vezikul. Lipidové vezikuly nachází širokého uplatnění při studiu biologických membrán. Podstatným důvodem pro volbu tohoto systému je poměrně jednoduchý a přesně daný způsob přípravy, kterým je možné připravit vezikuly o různých velikostech a o různém značení.

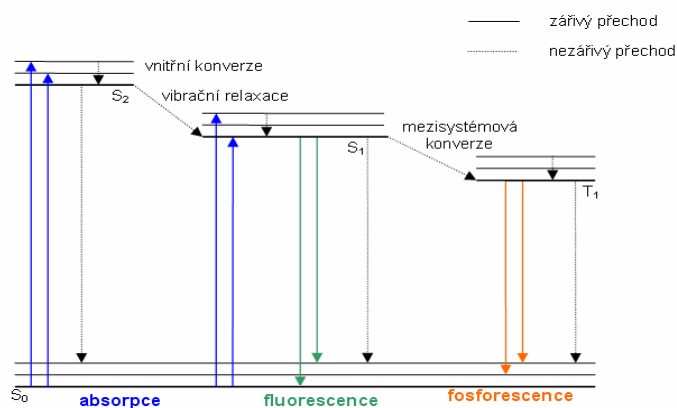
Prvním cílem této práce je porovnat velikosti vezikul naměřené pomocí fluorescenční korelační spektroskopie s výsledky poskytnutými metodou rozptylu světla, což je standardní metoda pro určování velikostí molekul. Druhým cílem je stanovení průměrného počtu fluorescenčních emiterů umístěných na jedné vezikule metodami dvoubarevné fluorescenční kroskorelační spektroskopie, časově rozlišené fluorescenční korelační spektroskopie a antibunchingu. Třetím cílem je porovnat použité metody z hlediska praktické použitelnosti a možných budoucích aplikací na složitější systémy.

2 Teoretická část

V této kapitole budou stručně popsány fyzikální a chemické základy potřebné pro pochopení a vyhodnocení metod použitých v experimentech. Nejdříve se budeme zabývat jevem fluorescence a látkami, které jsou schopné fluoreskovat, poté použitým lipidovým systémem a možnostmi, jak se molekuly v roztoku pohybují. Další část bude věnována popisu konkrétních metod.

2.1 Fluorescence

Luminiscence je proces, kdy látka emituje světlo z vyšších energetických (excitovaných) hladin. Po excitaci látky světlem (v ultrafialové nebo viditelné oblasti) dochází k fotoluminiscenci, která se formálně dělí na fluorescenci a fosforescenci v závislosti na elektronovém uspořádání excitovaného stavu. Procesy, které se dějí při absorpci a emisi světla ilustruje Jablonského diagram (Obr. 1) [1], [2].



Obr. 1 Jablonského diagram schématicky znázorňuje excitaci fotonu ze základního elektronového stavu S_0 do vyšších elektronových stavů S_1 či S_2 , relaxaci do nejnižších vibračních hladin daných stavů, vnitřní konverzi z S_2 do S_1 a následnou fluorescenci, popř. přechod do tripletového stavu T_1 a fosforescenci. Kromě zářivých přenosů jsou v obrázku naznačeny i nezářivé přechody.

Při absorpci fotonu přechází molekula ze základního stavu do vyššího, typicky singletního, excitovaného stavu. Excitace většinou probíhá z nejnižší vibrační hladiny základního stavu (za pokojové teploty nejsou vyšší hladiny základního stavu populované) do vyšší vibrační hladiny excitovaného stavu. Absorpce je velmi rychlý proces s dobou trvání přibližně 10^{-15} s. Po absorpci fotonu vzorkem nejčastěji dochází k relaxaci do základní vibrační hladiny prvního excitovaného stavu. K tomuto přechodu dochází nezářivými procesy vibrační relaxace (přechod z vyšší vibrační hladiny do základní vibrační hladiny daného excitovaného stavu, na časové škále 10^{-12} - 10^{-10} s) a vnitřní konverze (přechod z vyššího excitovaného stavu do nižšího, 10^{-14} - 10^{-10} s). Uvolněná energie je předána okolním molekulám (nejčastěji rozpouštědla) v průběhu srážek s excitovaným vzorkem. Následná relaxace do základního elektronového stavu může probíhat zářivým i nezářivým přechodem. Pokud se během relaxace nemění multiplicita (relaxace probíhá ze singletového stavu), pak se zářivý přechod nazývá fluorescence (10^{-9} - 10^{-7} s). Zářivý přechod se změnou multiplicity (z tripletového stavu) se nazývá fosforescence. Tento přechod je zakázaný a tedy poměrně pomalý (10^{-3} – 100 s). Fosforescenci typicky předchází nezářivý přechod, při kterém dochází ke změně multiplicity (přechod ze singletového do tripletového stavu), který se nazývá

mezisystémová konverze. Speciálním případem fotoluminiscence je zpožděná fluorescence, kdy se molekula po relaxaci do tripletového stavu vrátí do singletového a emituje foton. Návrat z vyššího elektronového stavu do základního se může dít i jinými nezáživými procesy.

2.2 Fluorofory

Látky schopné fluoreskovat se nazývají fluorofory [2]. Dělí se na vlastní (intrinsic; přirozený výskyt) a nevlastní (extrinsic; přidávají se ke vzorkům, které nemají vhodné fluorescenční vlastnosti).

Emisní spektra fluoroforů jsou dána závislostí intenzity fluorescence na vlnové délce emitovaného záření při konstantní délce excitačního záření. Fluoreskující látky a jejich spektra vykazují speciální charakteristiky, které zde budou stručně popsány. Po excitaci látky dochází k rychlé ztrátě části absorbované energie vibrační relaxací do nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu. Energie následně vyzářeného fotonu je tedy nižší než energie přijatá při absorpci fotonu. Fluorescenční emisní spektrum se posune k delším vlnovým délkám (Stokesův posun). Relaxace do nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu také způsobí, že fluorescenční emisní spektrum je většinou pro danou látku neměnné a nezávisí na vlnové délce použitého excitačního záření (samozřejmě za předpokladu, že zvolená vlnová délka způsobí excitaci).

Fluorofory jsou obecně charakterizovány těmito veličinami: molární absorpční koeficient ε , kvantový výtěžek Q (quantum yield) a doba života fluoroforu $\tau_{lifetime}$ (fluorescence lifetime). Molární absorpční koeficient ε je mírou schopnosti fluoroforu absorbovat světlo. Kvantový výtěžek Q je dán poměrem počtu emitovaných fotonů vůči počtu absorbovaných fotonů. Kvantový výtěžek Q vyjadřuje míru účinnosti fluorescenční emise vůči všem možným způsobům navrácení se z excitovaného stavu do základního stavu. Doba života fluoroforu $\tau_{lifetime}$ udává průměrný čas, po který se molekula nachází v excitovaném stavu. Během excitovaného stavu fluorofor může podléhat různým konformačním změnám, chemickým reakcím nebo rotační a translační difúzi. Doba života excitovaného stavu fluoroforu se někdy definuje jako čas, kdy intenzita fluorescence klesne na $1/e$ své počáteční hodnoty (přibližně na 37 % $F(0)$). Dohasínání fluorescence v čase lze pro jeden typ excitovaného stavu vyjádřit exponenciální závislostí

$$F(t) = F(0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{lifetime}}}, \quad (1)$$

kde $F(t)$ je intenzita fluorescenčního záření v čase t , $F(0)$ je intenzita záření pozorovaná okamžitě po excitaci. Pro více typů excitovaných stavů měřených současně (více různých fluoroforů, fluorofor v různých konformacích či prostředích) je pak dohasínání sumou více exponenciál.

Intenzita fluorescenčního záření může být snížena zhášením (quenching). Zhášení se děje dvěma způsoby – jako statické (static quenching), kdy fluorofor vytvoří se zhášecím činidlem komplex, který není schopen absorbovat excitační záření, a srážkové (collisional quenching), kdy je fluorofor v excitovaném stavu deaktivován po srážce se zhášecím činidlem. Proces, při kterém dojde k nevratnému zničení fluoroforu se nazývá fotovybělování (photobleaching).

2.3 Lipidy, vezikuly

Termín lipidy nelze přesně definovat, většinou se používá pro sloučeniny, které jsou téměř nebo zcela nerozpustné ve vodě, avšak rozpustné v organických rozpouštědlech. Mezi hlavní biologické funkce lipidů patří, že tvoří: hlavní zásobní formu uhlíku a energie, biologické membrány, prekursorů dalších důležitých látek (např. vitamíny, hormony), izolační bariéru vůči teplotnímu, elektrickému nebo jinému fyzikálnímu šoku a ochranný obal organismů či buněk vůči infekci nebo dehydrataci. Lipidy [3] se ze strukturního hlediska dělí na jednoduché, složené a odvozené. Mezi jednoduché lipidy patří acylglyceroly a vosky, tedy estery mastných kyselin a alkoholů. Složené lipidy obsahují další složky, podle kterých se dělí na glykoacylglyceroly, fosfoacylglyceroly, sfingomyeliny, cerebrosidy a gangliosidy. Odvozené lipidy zahrnují všechny ostatní sloučeniny lipidní povahy (prostaglandiny, steroidy, karotenoidy, lipofilní vitamíny).

Lipidy obsahující fosfát (fosfoacylglyceroly a sfingomyeliny) se nazývají fosfolipidy. Jsou důležitou součástí biologických membrán všech typů. Fosfolipidy obsahují dvě odlišné oblasti: nepolární, hydrofobní oblast (hydrofobní „ocas“ tvořený mastnými kyselinami) a polární, hydrofilní část (hydrofilní „hlava“ reprezentovaná glycerolem, kyselinou fosforečnou a příslušnou funkční skupinou). Příklad je uveden na Obr. 2c. Látky vykazující tento duální charakter se nazývají amfifilní (amfipatické). Amfifilní látky mají samovolnou tendenci organizovat se do tvaru, kdy polární „hlavy“ pomocí vodíkových můstků a elektrostatických interakcí reagují s vodným prostředím, zatímco hydrofobní řetězce tvoří vnitřní nepolární část [4]. V závislosti na typu zúčastněných lipidů, na teplotě a koncentračních poměrech mohou vznikat různé struktury: micely, vezikuly a liposomy, či rovinné dvojvrstvy (Obr. 2a), jež jsou základem biologických membrán.

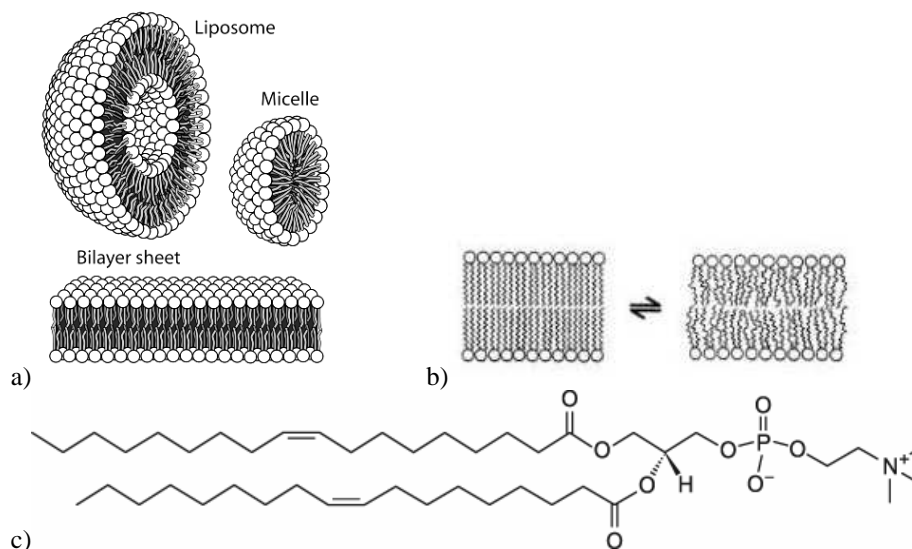
Podle [5] se vezikuly definují jako sférické či elipsodní mono- nebo multikompartmentové struktury tvořené dvojvrstvami amfifilních sloučenin bez ohledu na jejich chemické složení. Vezikuly tvořené přírodními či syntetickými fosfolipidy se pak označují jako liposomy. Toto rozdělení není striktní, termíny vezikula a liposom lze považovat za synonyma. Vezikuly se dle [6] klasifikují podle velikosti a podle počtu fosfolipidových dvojvrstev (lamel), ze kterých byly vytvořeny na unilamelární a multilamelární. Podle velikosti se dělí na malé (small, průměr vezikuly < 100nm), velké (large, 100 – 1000 nm) a obří (giant, > 1 μm).

Lipidy v membráně (či lipidové dvojvrstvě nebo vezikule) se většinou nacházejí v tekuté formě. Čisté amfifilní látky přechází z tekuté formy do gelové a naopak při teplotě fázového přechodu T_c [7]. Pod hodnotou teploty fázového přechodu jsou hydrofobní řetězce (řetězce mastných kyselin) nataženy a paralelně orientovány (gelová forma), nad teplotou T_c je uspořádání řetězců volnější (tekutá forma) (Obr. 2b). V případě, že lipidové membrány obsahují více druhů amfifilních látek, přechod mezi kapalným a gelovým stavem není ostrý a je doprovázen oddělením obou fází. Nad teplotou fázového přechodu se lipidy v membráně pohybují (laterální difúze) a otáčejí (rotační difúze) řádově rychleji než v gelové fázi.

Samotné lipidy nevykazují fluorescenci, pro fluorescenční studie je třeba fluorescenční značku (viz. oddíl 2.2) přidat. Fluorescenční barviva se nejčastěji přidávají při přípravě vezikul, jejich rozdělení je tedy náhodné a řídí se Poissonovskou distribucí:

$$f(k; \gamma) = \frac{\gamma^k e^{-\gamma}}{k!}, \quad (2)$$

kde γ je střední hodnota Poissonova rozdělení, k je počet událostí, které sledujeme (např. $k = 2$, když hledáme pravděpodobnost, že lipidy jsou označeny dvěma fluorescenčními značkami).



Obr. 2 a) Lipidové struktury ve vodném prostředí. Obrázek převzat z [8]

b) Schématické znázornění fázového přechodu v dvojvrstvě. Obrázek převzat z [5]

c) Příklad fosfolipidu: 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin (DOPC). Obrázek převzat z [9]

2.4 Difúze

Látky ve vodném prostředí podléhají náhodnému Brownovskému pohybu, jehož důsledkem difundují, tedy se pohybují proti směru koncentračního gradientu. Difúze je popsána Fickovými zákony [10]:

$$J = -D \nabla c, \quad (3)$$

kde J je tok látky, který udává, jaké množství látky projde danou plochou za daný čas, D je difúzní koeficient, c koncentrace látky. Z prvního Fickova zákona vyplývá, že pokud se koncentrace látky rychle mění s pozicí, pak je difúze do okolí rychlá. Druhý Fickův zákon neboli difúzní rovnice popisuje časový vývoj koncentrace v systému

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \Delta c \quad (4)$$

Velikost difúzního koeficientu je možné získat ze Stokes-Einsteinova vztahu

$$D = \frac{k_B T}{f}, \quad (5)$$

kde k_B je Boltzmannova konstanta, T teplota a f třecí síla. Pro sférické částice o poloměru a má rovnice tvar

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a}, \quad (6)$$

kde η je viskozitní koeficient rozpouštědla. V praxi jsou velké molekuly většinou solvatované a nejsou sférické. Ze znalosti difúzního a viskozitního koeficientu a teploty lze použitím vztahu (6) určit hydrodynamický poloměr r_H velké molekuly. Hydrodynamický poloměr r_H se definuje jako poloměr koule, jejíž hydrodynamické chování je za dané teploty ve stejném disperzním prostředí stejné jako chování sledované disperzní částice [11]. V dalším textu bude tento vztah několikrát zmíněn, proto je zde přepsán do následujícího tvaru:

$$r_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}. \quad (7)$$

2.5 Fluorescenční korelační spektroskopie

Fluorescenční korelační spektroskopie (fluorescence correlation spectroscopy, FCS) je metoda založená na pozorování fluktuací intenzity fluorescence malého množství entit v čase [1]. Fluktuace jsou způsobeny dynamickými, fotofyzikálními či chemickými procesy, nejčastěji translační difuzí v nehomogenním excitačně-detekčním prostředí.

Základy metody FCS byly položeny na začátku 70. let 20. století, kdy Magde, Elson a Webb [12] sledovali fluktuace fluorescenčního signálu při vzniku fluorescenčního komplexu DNA a barviva (EtBr). Měření FCS bylo z počátku doprovázeno mnoha komplikacemi, metoda nebyla obecně rozšířena. FCS se začala více aplikovat až v 90. letech, kdy došlo k mnoha zlepšením technických součástí spektroskopické aparatury (např. vývoj vysokoúčinných lavinových fotodiod a stabilních laserů). Od té doby je možné FCS použít např. k měření translační difúze, rotační difúze, chemické kinetiky, molekulárních interakcí i konformačních změn. FCS byla rozvinuta do mnoha dalších technik, např. FCCS, polarizační FCS, antibunching nebo FLCS.

FCS je obvykle měřena pomocí invertovaného epifluorescenčního konfokálního mikroskopu (Obr. 3) [13]. Jako zdroj excitačního záření se používá laser. Paprsek excitačního světla je odražen na dichroickém zrcadle do objektivu, kterým je zaostřen do vzorku. Vzorkem emitované fluorescenční světlo je sbíráno tím samým objektivem a dále vedeno skrz dichroické zrcadlo, emisní filtry a konfokální štěrbinu (pinhole) do detektoru. Konfokální štěrbinu je prostorový filtr, který blokuje světlo, jenž pochází z oblastí mimo ohniskovou rovinu. Jako detektory jsou nyní nejčastěji používány lavinové fotodiody (avalanche photodiode, APD). Aby byly fluktuace intenzity dobře rozlišitelné od průměrného signálu intenzity (tedy aby byl dostatečně vysoký poměr signálu vůči šumu, signal-to-noise ratio), je nutné pracovat na úrovni jednotlivých molekul, což při velikosti konfokálního detekčního objemu kolem 1 fl znamená používat přibližně 1 nM roztoky fluorescenčně značených látek.

Při měření se zaznamenává časový vývoj intenzity, který se analyzuje pomocí autokorelační funkce $G(\tau)$ [13]. Normalizovaná autokorelační funkce $G(\tau)$ je definována tímto vztahem

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (8)$$

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle, \quad (9)$$

$$\langle F(t) \rangle = \frac{1}{t_{celk}} \int_0^{t_{celk}} F(t) dt \quad (10)$$

kde $\delta F(t)$ značí fluktuace fluorescenčního signálu za předpokladu, že se intenzita excitačního záření nemění. Fluktuace signálu se popisují jako rozdíl hodnoty intenzity fluorescence $F(t)$ v čase t a časově zprůměrované intenzity $\langle F(t) \rangle$. t_{celk} je doba, po kterou byl signál sbírán. Pokud fluktuace vznikají pouze změnou lokální koncentrace barviva δC v místě detekce, pak je lze popsat (podle [14])

$$\delta F(t) = \int_V W(r) \delta(\mu C(r, t)) dV, \quad (11)$$

kde $W(r)$ označuje prostorové rozložení emitovaného světla a μ udává počet detekovaných fotonů na molekulu za sekundu (svítivost). Parametr μ lze vyjádřit (podle [13])

$$\mu = I_{\max} \kappa \sigma Q, \quad (12)$$

kde κ označuje účinnost detekce, σ účinný průřez absorpce světla, Q kvantový výtěžek, I_{\max} je maximální hodnota intenzity excitačního světla $I_{ex}(r)$. $W(r)$ je často aproximováno třírozměrnou Gaussovskou funkcí

$$W(r) = e^{-\frac{x^2+y^2}{r_0^2}} e^{-\frac{z^2}{z_0^2}}, \quad (13)$$

kde r_0 označuje poloměr detekčního (efektivního) objemu V_{eff} a z_0 jeho poloviční výšku.

$$V_{eff} = \pi^{\frac{3}{2}} r_0^2 z_0 \quad (14)$$

Detekční objem není ostře ohraničen, jeho velikost se definuje prostorem, kde je intenzita detekovaného světla větší než $1/e^2$ maxima detekované intenzity. Velikost detekčního objemu se typicky pohybuje okolo hodnoty 1 fl.

Autokorelační funkce ukazuje, jak spolu souvisí intenzita signálu v čase t a v čase $t+\tau$. τ (delay time) je čas mezi dvěma měřeními, mezi nimiž zkoumáme souvislost. Za předpokladu, že se během experimentu nemění fluorescenční vlastnosti fluoroforu $\delta\mu = 0$, že detekční objem je charakterizován trojrozměrným Gaussiánem a že uvažujeme pouze částice přemísťující se volnou difúzí ve třírozměrném prostoru s difúzním koeficientem D , má autokorelační funkce tvar

$$G(\tau) = \frac{1}{V_{eff} \langle C \rangle} \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \frac{\tau}{\tau_D}}} \quad (15)$$

kde $\langle C \rangle$ je lokální průměrná koncentrace fluoroforů v detekčním objemu a τ_D je difúzní čas, který udává, jak průměrně dlouho zůstane molekula v detekčním objemu. Z hodnoty τ_D lze určit difúzní koeficient D dle vztahu:

$$D = \frac{r_0^2}{4\tau_D} \quad (16)$$

Amplituda autokorelační funkce pro čas $\tau = 0$ udává průměrný počet fluoroforů $\langle N \rangle$ (particle number) v detekčním objemu.

$$G(0) = \frac{1}{V_{eff} \langle C \rangle} = \frac{1}{\langle N \rangle} \quad (17)$$

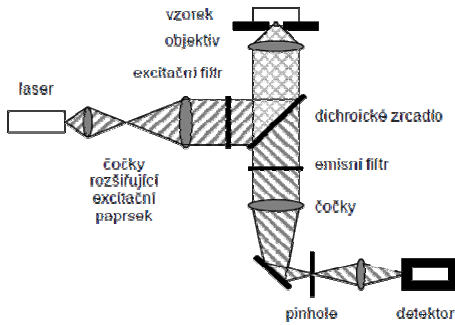
K odvození výše zmíněných rovnic byl použit předpoklad, že $\delta\mu = 0$. Pro reálná barviva tento předpoklad neplatí, dochází k „blikání“, kdy látka střídavě vykazuje a nevykazuje fluorescenci. Nejčastější příčinou „blikání“ je přechod do tripletového stavu. Mezi další příčiny patří změna konformace molekuly nebo chemická reakce. Tyto příspěvky způsobují fluktuace signálu a musí být zahrnuty do autokorelační funkce (Obr. 4). Pokud je „blikání“ kratším procesem než difúze a pokud nedochází ke změně difúzního koeficientu D , pak lze příspěvky těchto jevů odseparovat a výsledná korelační funkce $G_{total}(\tau)$ je jejich součinem [13].

$$G_{total}(\tau) = G_{diffusion}(\tau) \cdot G_{triplet}(\tau) \quad (18)$$

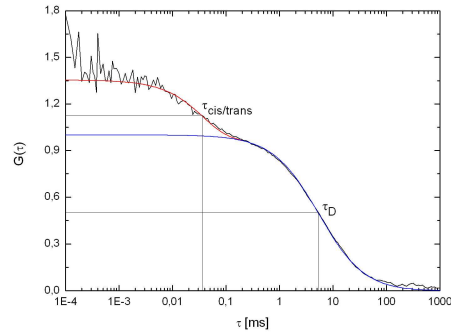
$$G_{triplet}(\tau) = 1 + \frac{\bar{T}}{1 - \bar{T}} e^{-\frac{\tau}{\tau_{triplet}}} \quad (19)$$

$G_{diffusion}(\tau)$ a $G_{triplet}(\tau)$ jsou korelační funkce popisující difúzi a přechod do tripletového stavu. \bar{T} je frakce molekul v tripletním stavu, $\tau_{triplet}$ je čas popisující relaxaci singlet-

triplet systému. Obdobným způsobem lze popsat i další fotofyzikální jevy (např. cis-trans izomerizaci).



Obr. 3 Schéma mikroskopu. Převzato z [14].



Obr. 4 Příklad normalizované autokorelační křivky pro barvivo (navázané na vezikule) se dvěma možnými konformacemi, přičemž jen jedna z nich je fluorescenční. Při zobrazování korelačních křivek je vždy vynášena hodnota korelační funkce $G(\tau)$ proti τ (delay time) v logaritmické stupnici.

2.6 Dvoubarevná fluorescenční kroskorelační spektroskopie

Klasická FCS je vhodná při charakterizaci systému obsahující jeden typ částic. Jak již bylo zmíněno, je možné jí rozlišit různé stavy fluoroforu. Pro směsi se příspěvky jednotlivých typů částic od sebe špatně separují. Jako příklad lze uvést, že pomocí klasické FCS se téměř nedá sledovat průběh slučovací reakce. Difúzní časy jsou sice pro různé látky (reaktanty a produkty) rozdílné, ale protože difúzní koeficient je jen slabě závislý na molekulové hmotnosti pozorované částice, pak rozdíl v difúzních časech v korelační křivce není příliš patrný. Kvůli nemožnosti odlišení příspěvků od různých částic byla zavedena dvoubarevná fluorescenční kroskorelační spektroskopie (FCCS, fluorescence cross-correlation spectroscopy) [15], která sleduje podobnost signálu jednoho barviva s dalším barvivem po určitém časovém úseku τ . Dva fluorofory A a B s různými emisními spektry jsou ozářeny dvěma lasery, emitované světlo je vedeno přes konfokální šterbinu, dichroické zrcadlo (spektrálně separující fluorescenci použitých barviv) a filtry ke dvěma detektorům. Korelace signálu z prvního detektoru je určena autokorelační křivkou $G_A(\tau)$, korelace signálu z druhého detektoru je určena autokorelační křivkou $G_B(\tau)$, korelace signálu z prvního a druhého detektoru je určena kroskorelační křivkou $G_{AB}(\tau)$. Pokud se v detekčním objemu pohybuje pouze molekula označená jedním barvivem, je zaznamenána pouze jedním detektorem. Když je molekula značená dvěma různými barvivy, je zaznamenána oběma detektory a lze určit kroskorelaci (Obr. 5). Pro kvantitativní určení kroskorelace je nutné, aby se detekční objemy vytvořené oběma lasery zcela překrývaly [16]. Pokud jsou emisní charakteristiky μ a $W(r)$ stejné, lze pro korelační funkce odvodit tvar (podle [15])

$$G_i(\tau) = \frac{\langle C_i \rangle \text{Diff}_i(\tau) + \langle C_{AB} \rangle \text{Diff}_{AB}(\tau)}{V_{\text{eff}} (\langle C_i \rangle + \langle C_{AB} \rangle)^2} \quad \text{pro } i = A, B \quad (20)$$

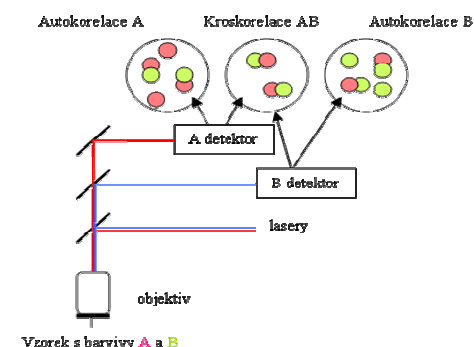
$$G_{AB}(\tau) = \frac{\langle C_{AB} \rangle \text{Diff}_{AB}(\tau)}{V_{\text{eff}} (\langle C_A \rangle + \langle C_{AB} \rangle)(\langle C_B \rangle + \langle C_{AB} \rangle)} \quad (21)$$

kde C_A , C_B jsou koncentrace molekul značených jedním barvivem, C_{AB} je koncentrace molekul značených oběma barvivy, $\text{Diff}_i(\tau)$ popisuje difúzní část pohybu i -tého

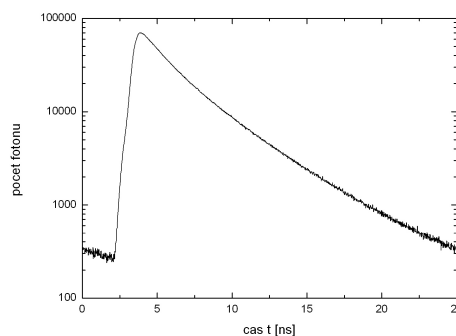
fluoroforu (část korelační funkce obsahující difúzní časy τ_D), $Diff_{AB}(\tau)$ popisuje difúzní pohyb molekuly značené oběma barvivy. Přepsáním vztahů (20) a (21) lze určit průměrný počet molekul ve vzorku značených jedním ($\langle N_i \rangle$, $i = A, B$) či dvěma různými barvivy ($\langle N_{AB} \rangle$):

$$\langle N_{AB} \rangle = \frac{G_{AB}(0)}{G_A(0) G_B(0)} \quad (22)$$

$$\langle N_i \rangle = \frac{1}{G_i(0)} - \langle N_{AB} \rangle \quad (23)$$



Obr. 5 Schéma měření FCCS



Obr. 6 Příklad histogramu dob příchodů fotonů

2.7 Časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie

Časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie (fluorescence lifetime correlation spectroscopy, FLCS) využívá kombinace FCS a TCSPC [17]. TCSPC (time-correlated single photon counting, časově korelované čítání fotonů) je metoda, která měří dobu mezi excitací fluoroforu a emisí fotonu.

V metodě FLCS je vzorek excitován pulzním laserem, emitované fotony jsou detekovány v tzv. TTTR módu (time-tagged time-resolved) [18]. Při detekci fotonu v TTTR módu se zaznamenávají informace o makroskopickém a mikroskopickém čase příchodu fotonu a číslo detektoru, kterým byl foton zjištěn (v případě použití více detektorů). Makroskopický čas je určen dobou mezi začátkem experimentu a detekcí fotonu, čas je měřen s přesností desítek nanosekund. Makroskopický čas zahrnuje informace např. o translačním pohybu či přechodu do tripletového stavu. Čas detekce fotonu měřený vůči excitačnímu pulzu se nazývá mikroskopický čas. Tento čas je měřen s přesností pikosekund. Histogram dob příchodů fotonů zobrazuje dohasínání fluoroforu (Obr. 6). Analýzou histogramu lze určit dobu života excitovaného stavu fluoroforu.

FLCS využívá mikroskopický čas pro oddělení složek s různými dobami života nezávisle na tom, že se emisní spektra jednotlivých složek mohou překrývat a že složky mohou mít shodné difúzní časy. Podmínkou je, aby se doba života složky neměnila v čase.

Při měření směsi dvou fluoroforů A a B s různou dobou života se informace o jednotlivých fotonech ukládají v TTTR módu. Pro oddělení příspěvků obou fluoroforů je nutné z dat uložených v TTTR módu sestavit TCSPC histogramy pro jednotlivé fluorofory (data se získávají např. proměřením čistých barviv). Z histogramů čistých složek a z histogramu analyzované směsi se odvodí statistické filtry (přesněji v [19]). Statistické filtry jsou funkce udávající míru příspěvku fotonů složky A (B) do TCSPC histogramu směsi AB. Tyto statistické filtry jsou aplikovány na TTTR data směsi

fluoroforů, čímž se získají autokorelační křivky jednotlivých fluoroforů a jejich kroskorelace.

FLCS se využívá k vyhodnocení dat i v případě přítomnosti jen jednoho typu barviva, protože FLCS umožňuje rozlišit fluorescenční signál a šum, potlačuje afterpulsing a vliv rozptýleného světla [17]. Afterpulsing je vlastnost detektorů [20]. Za určitých podmínek detektor chvíli po pozitivním přijetí fotonu emitovaného vzorkem vygeneruje falešný signál, který je také zaznamenán a který způsobuje výchyly v autokorelační křivce (zvláště na mikrosekundové škále).

Počet fluorescenčně značených stavebních jednotek na funkční jednotku se stanoví z amplitud auto- a kros- korelačních křivek za předpokladu, že stavební jednotky jsou označeny jedním ze dvou druhů barviv s rozdílnou dobou života. Systém se optimálně označí shodnou koncentrací obou barviv, což lze ověřit z amplitud autokorelačních křivek. Poměr amplitud kros- a auto- korelačních křivek poté udává frakci částic značených oběma barviv (vztahy (22) a (23)). Čím více fluorescenčně značených stavebních jednotek na funkční jednotku máme, tím větší bude amplituda kroskorelační křivky. Jako příklad můžeme uvést oligomerní systémy. Pro monomery je frakce částic značených oběma barviv nulová, pro dimery je 0,5, pro trimery 0,75, atd.

2.8 Antibunching

Antibunching je metoda, pomocí které lze získat informaci o množství na sobě nezávislých fluoroforů na molekule či komplexu [21]. Tato metoda využívá faktu, že molekula v daném čase nemůže vyzářit více než jeden foton. Pravděpodobnost, že dva fotony naměřené se zpožděním τ pocházejí ze stejné molekuly, klesá k nule pro τ jdoucí k nule. Tento jev ovlivňuje korelační funkci $G(\tau)$. V případě, že pozorujeme pouze jeden fluorofor, je foton vyzářený v čase $\tau = 0$ detekován maximálně jedním detektorem, kroskorelace signálu ze dvou detektorů v čase $\tau = 0$ je tudíž nulová. V čase $\tau = 0$ je hodnota korelační funkce i pro více molekul obecně nižší než pro čas τ_i (Obr. 7), kdy se molekula ještě vyskytuje v detekčním objemu ($\tau_i < \tau_D$). Jako zdroj excitačního záření se obvykle používá pulzní laser, hodnota korelační křivky $G(\tau_i)$ je tedy určena maximálními amplitudami jednotlivých pulzů.

Vliv antibunchingu na korelační křivku je pozorovatelný v oblasti doby života excitovaného stavu fluoroforu (nanosekundy). Aby tato metoda poskytla co nejlepší výsledky, je třeba použít fotostabilní barviva a detekovat dostatečně vysoký počet fotonů, což dělá metodu časově náročnou.

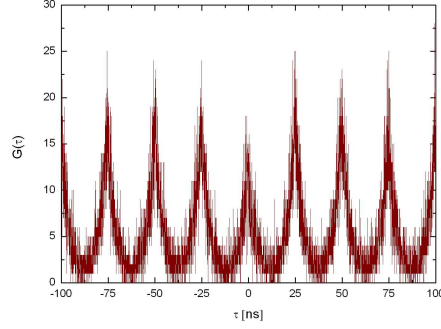
Počet nezávislých emiterů n na molekule lze získat na základě tohoto vztahu (podle [21]):

$$n = \frac{G(\tau_i) - G(\infty)}{G(\tau_i) - G(0)} \quad (24)$$

kde $G(0)$ udává hodnotu autokorelační křivky v čase $\tau = 0$, $G(\tau_i)$ v čase τ_i , $G(\infty)$ po nekonečně dlouhém časovém úseku. Situace se komplikuje, pokud fluorofor vykazuje fotofyzikální relaxaci (vysokou frakci molekul v tripletovém stavu, přechody mezi cis a trans konfigurací, rotační difúzi apod). Potom se výše zmíněný vztah musí upravit tak, aby dané jevy zahrnoval.

$$n = \frac{G(\tau_i) - G(\infty)}{G(\tau_i) - G(0)} \frac{PN \cdot (1 - TR1 - TR2)}{PN \cdot (1 - TR1 - TR2) + TR1 + TR2}, \quad (25)$$

kde PN, TR1 a TR2 jsou parametry získané z fitu (PN - počet částic v detekčním objemu, TR1 a TR2 - frakce částic podstupující různé fotofyzikální jevy).



Obr. 7 Antibunching – snížení amplitudy v $\tau = 0$. Pro názornost je kroskorelace druhého s prvním kanálem zobrazena v závislosti na $-\tau$. Kladné hodnoty τ zobrazují kroskorelaci prvního s druhým kanálem.

2.9 Rozptyl světla

Prochází-li světlo látkou, indukuje elektrické pole světelné vlny v molekulách oscilující dipólové momenty, které působí jako zdroje rozptýleného záření [22]. Rozptýlené záření má stejnou vlnovou délku jako primární záření. Intenzita rozptylu je ovlivněna velikostí částic a typem sledované soustavy [23].

Molekuly plynu se při malých hustotách chovají jako nezávislé částice. Pohybují se neuspořádaně, paprsky rozptýleného světla jednotlivých molekul se neovlivňují. Celková intenzita rozptýleného záření je tedy dána součtem jednotlivých příspěvků v rozptylujícím objemu. Vzhledem k malé hustotě částic je rozptyl v plynech slabý.

V krystalech jsou jednotlivé částice pravidelně uspořádány, dochází zde k destruktivní interferenci paprsků. Ideální krystaly tedy světlo nerozptylují. Rozptyl způsobený reálnými krystaly je velice slabý, závisí na počtu a rozsahu poruch v krystalové mřížce.

V kapalinách dochází k rozptylu záření díky fluktuacím polarizovatelnosti α , které jsou způsobeny teplotními, hustotními popř. koncentračními fluktuacemi.

Malé částice v kapalině (jejichž rozměry nepřesahují dvacetinu vlnové délky použitého světla) rozptylují záření jako bodové zdroje (izolované dipóly). Intenzita rozptýleného záření je v závislosti na úhlu θ (úhel sevřený primárním paprskem a paprskem rozptýleného světla) určena Rayleighovým vzorcem

$$I(\theta) = \frac{16\pi^4 \alpha^2 I_0}{\lambda^4 r_{\text{det}}^2} \cdot \frac{1 + \cos^2 \theta}{2}, \quad (26)$$

kde α je polarizovatelnost dané částice, r_{det} její vzdálenost od detektoru, I_0 je intenzita nepolarizovaného primárního paprsku a λ vlnová délka rozptýleného záření. Ve většině měření se dnes používá vertikálně polarizované světlo, kdy

$$I(\theta) = \frac{8\pi^4 \alpha^2 I_0}{\lambda^4 r_{\text{det}}^2}, \quad (27)$$

Ze vztahů (26) a (27) plyne, že intenzita rozptýleného záření $I(\theta)$ je přímo úměrná I_0 a druhé mocnině polarizovatelnosti α . Intenzita $I(\theta)$ prudce klesá s rostoucí vlnovou délkou λ .

Větší částice se chovají jako soubor dipólů. Rozptýlené záření se zeslabuje interferencí. Úhlová závislost intenzity světla rozptýleného velkou částicí se vyjadřuje rozptylovou funkcí $P(\theta)$. Rozptylová funkce vyjadřuje zeslabení intenzity rozptýleného

záření v kapalinách v důsledku interference a závisí na velikosti a tvaru rozptylujících částic. Pro malé hodnoty θ lze funkci $P(\theta)$ aproximovat vztahem (podle [23]):

$$P^{-1}(\theta) \cong 1 - \frac{1}{3} \langle R_G^2 \rangle q^2, \quad (28)$$

kde \mathbf{q} je rozptylový vektor a R_G gyrační poloměr molekuly. Velikost rozptylového vektoru:

$$q = \frac{4\pi n_{rozp}}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}, \quad (29)$$

kde n_{rozp} je index lomu rozpouštědla. U tuhé částice, skládající se z hmotných elementů o hmotnosti m_i umístěných ve vzdálenosti r_i od těžiště částice, je gyrační poloměr R_G definován podle [11] jako

$$\langle R_G^2 \rangle = \frac{\sum_i m_i r_i^2}{\sum_i m_i}. \quad (30)$$

Další veličinou používanou k vyhodnocení dat získaných metodou rozptylu světla je Rayleighův poměr $R(\theta)$ definovaný (pro vertikální polarizaci primárního paprsku, podle [23]):

$$R(\theta) = \frac{I(\theta) r_{det}^2}{I_0}. \quad (31)$$

Pro vyhodnocení experimentálních dat Zimmovou metodou se používá přibližná rovnice

$$\frac{Kc}{\Delta R(\theta, c)} = \frac{1}{MP(\theta)} + 2Bc + \dots, \quad (32)$$

kde

$$\Delta R(\theta, c) = R(\theta, c) - R_0(\theta) \quad (33)$$

$$K = \frac{4\pi^2 n_{rozp}^2 \left(\frac{dn_{roztok}}{dc} \right)^2}{\lambda^4 N_A} \quad (34)$$

kde M značí molární hmotnost rozptylující částice, B je druhý viriální koeficient, $\Delta R(\theta, c)$ označuje přírůstek Rayleighova rozptylu, R , R_0 a ΔR odpovídají postupně roztoku, čistému rozpouštědlu a příspěvku rozpuštěných částic k celkovému rozptylu. K je rozptylová konstanta shrnující vlastnosti systému. n_{roztok} a n_{rozp} jsou indexy lomu roztoku a čistého rozpouštědla, c koncentrace rozptylujících částic v roztoku.

Vynesením závislosti $\frac{Kc}{\Delta R(\theta, c)}$ na c a θ do grafu se získá Zimmův diagram.

Extrapolovaná hodnota $\frac{Kc}{\Delta R(\theta, c)}$ pro $c = 0$ udává reciprokou hodnotu molární

hmotnosti M (pro polydisperzní částice se získá hmotnostně vážená molární hmotnost). Ze směrnice křivky pro nulový úhel pozorování je možno stanovit druhý viriální koeficient B a ze směrnice křivky pro nulovou koncentraci hodnotu gyračního poloměru R_G (pro polydisperzní částice se určí zetový průměr kvadrátů gyračních poloměrů $\langle R_G^2 \rangle_z$).

Do této chvíle byla uvažována jen časově zprůměrovaná intenzita rozptýleného záření. Částice v roztoku difundují, dochází k okamžitým hustotním a koncentračním fluktuacím, které mění okamžitou časovou hodnotu intenzity rozptýleného záření $i(t, q)$ [22]. Okamžité výchyly intenzit lze sledovat pomocí metody dynamického rozptylu

světla (dynamic light scattering, DLS). Způsob, jakým se intenzita rozptýleného záření mění, lze popsat autokorelační funkcí

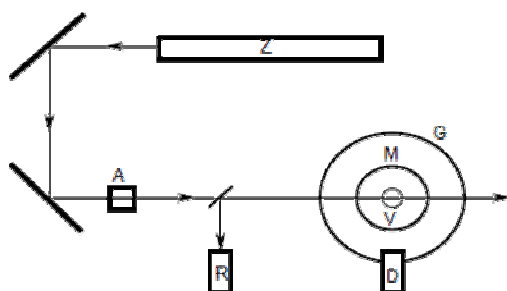
$$g(\tau, q) = \lim_{t_{celk} \rightarrow \infty} \frac{1}{t_{celk}} \int_0^{t_{celk}} i(t, q) i(t + \tau, q) dt, \quad (35)$$

kde t_{celk} je doba, po kterou byla intenzita měřena, a τ je časový interval. Autokorelační funkce popisuje míru korelace mezi velikostmi fluktuací oddělených od sebe časovým intervalem τ . Pro monodisperzní sférické částice pohybující se pouze translační difúzí lze autokorelační funkci napsat ve tvaru

$$g(\tau, q) = A [1 + \beta \exp(-2Dq^2\tau)], \quad (36)$$

kde A je amplituda a β je koherenční faktor, závislý na geometrii experimentálního uspořádání, D je difúzní koeficient. Podle Einstein-Stokesova vztahu (7), lze ze znalosti D určit hydrodynamický poloměr částice R_H .

Rozptyl světla se měří při tomto experimentálním uspořádání (Obr. 8) [22]: Zdroj světla Z (nejlépe koherentního a monochromatického) vyšle paprsek světla, jehož vlastnosti mohou dále upravovat optické filtry. Intenzitu primárního paprsku upravuje atenuátor A a měří referenční detektor R . Vzorek se v kyvetě vkládá do cylindrické měrné cely M . Detektor rozptýleného světla D je umístěn na otáčivém goniometru G . Signál z detektoru se přivádí do korelátoru, který provádí výpočet autokorelační funkce. Aby nedocházelo k rušení měření nežádoucím lomem rozptýleného záření na vnějších stěnách kyvety, je měrná cela naplněna izorefraktivní kapalinou (kapalinou o stejném nebo velmi podobném indexu lomu, jako má sklo). Vzorky je před měřením třeba dokonale zbavit prachu, protože intenzivní rozptyl z prachových částic přítomných v roztoku může měření zcela znehodnotit.



Obr. 8 Experimentální uspořádání při měření rozptylu světla. Obrázek převzat z [22]

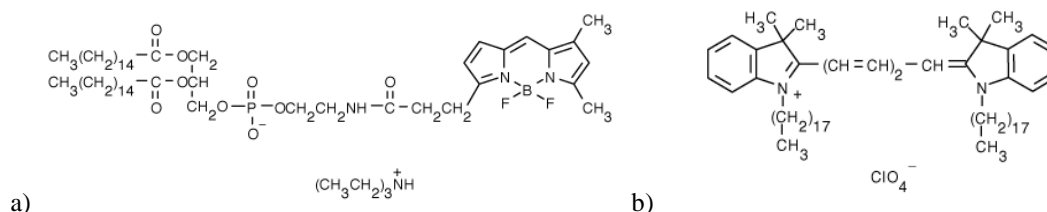
3 Experimentální část

V této kapitole bude nejdříve uvedeno, které látky byly použity pro experimenty, jakým způsobem byly zpracovávány a jaké bylo nastavení měřicích přístrojů. Ve druhé části jsou ukázány a zhodnoceny dosažené výsledky.

3.1 Experimentální uspořádání

3.1.1 Materiály

Lipidy 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin (DOPC) byly zakoupeny od Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL). Fluorescenční barviva DiD (1,1'-dioktadecyl-3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate) a D3800 (*N*-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacene-3-propionyl)-1,2-dihexadekanoyl-*sn*-glycero-3-fosfoethanolamin, triethylamoniová sůl; BODIPY® FL DHPE) byly zakoupeny od Molecular Probes (Eugene, OR). Barvivo Atto633 připojené karboxamidovou vazbou k lipidu DOPE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosfoethanolamin) bylo připraveno spolupracovníkem (Atto633 od Atto-Tec (GmbH, Siegen, Germany); DOPE od Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL)). Dále jsou zmíněny základní informace o použitých barvivech [24], [25] (Obr. 9, Tab. 1):



Obr. 9 a) D3800, b) DiD (obě struktury převzaty z [24])

Tab. 1 Charakteristiky použitých barviv. λ_{abs} je vlnová délka maxima absorpce, λ_{fl} vlnová délka maxima fluorescenční emise, ϵ molární absorpční koeficient (pro DiD a D3800 určen v MeOH, pro Atto633 ve vodě).

barvivo	λ_{abs} [nm]	λ_{fl} [nm]	ϵ [cm ⁻¹ M ⁻¹]
Atto633	629	657	$1,3 \cdot 10^5$
DiD	644	665	$2,6 \cdot 10^5$
D3800	505	511	$8,7 \cdot 10^4$

DiD

Lipidový analog, fluoreskující v červené oblasti, kapalný při pokojové teplotě, slabě fluorescenční ve vodě, vysoce fluorescenční a fotostabilní uvnitř lipidových dvojvrstev. Jeho molární absorpční koeficient je extrémně vysoký, doba života excitovaného stavu (uvnitř dvojvrstvy) se pohybuje okolo 1 ns. Cis a trans konformace.

D3800

Fosfolipid s fluorescenční značkou kovalentně navázanou na aminovou skupinu v hlavě fosfolipidu. Fluoreskuje v zelené oblasti ve vodném i lipidovém prostředí.

Atto633

Červená fluorescenční značka, hydrofilní, fotostabilní. Složení výrobce neudává. Samotná značka se do lipidových systémů nezapojuje, je nutné ji nejprve kovalentně připojit k lipidu. Během experimentů byl používán systém Atto633-DOPE. Doba života excitovaného stavu se pohybuje okolo 4 ns. Pouze minimálně přechází do tripletového stavu.

Voda použitá v experimentech byla čištěna MilliQ čisticím systémem. Pufr obsahoval 10 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina), 2 mM EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina), 150 mM NaCl, 2 mM NaN₃, pH 7,4. Před použitím byl pufr přefiltrován na 0,2 µm filtru (Schleicher&Schuell, Německo). Rozpouštědla určená pro spektroskopii byla zakoupena od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

3.1.2 Příprava vezikul

Vezikuly byly připraveny podle protokolu [26]. Požadované množství roztoku DOPC v chloroformu a fluorescenčně značené látky v methanolu bylo smícháno v odpařovací baňce. Rozpouštědla byla odpařena na rotační vakuové odparce (RVO 004 Vitrum, Česká republika), poté byl přidán diethylether, který byl znovu odpařen. K suchému lipidovému filmu byl přidán 10 mM HEPES pufr, směs byla vortexována 3 minuty. Směs byla zmrazena a rozmrazena, znovu promíchána. Vezikuly (large unilamellar vesicles, LUV) byly připraveny extrudací přes polykarbonátové membrány (Avestin, Ottawa, Kanada) s danou velikostí pórů (50 nm, 100 nm, 200 nm nebo 400 nm). Vezikuly byly připravovány a měřeny při pokojové teplotě 23 °C.

Výsledná koncentrace lipidů v roztoku byla vždy 1 mM, většinou byly připravovány 2 ml roztoku lipidů. Množství barviva bylo zvoleno tak, aby vezikula složená z DOPC (area per lipid: 69 Å²/molekula) o předpokládaném poloměru r_H byla označena n_{prep} barvivy na vezikulu (obvykle $n_{prep} = 1; 10$). Ve výpočtech byl použit model jednolamelární vezikuly s dvěma lipidovými monovrstvami. Dále bylo použito přiblížení, že povrchy mají stejnou plochu danou vztahem

$$S = 4\pi r_H^2 \quad (37)$$

3.1.3 Instrumentální nastavení

FCS/FLCS

FLCS měření byla prováděna na invertovaném epifluorescenčním konfokálním mikroskopu MicroTime200 (PicoQuant, Německo) [27]. Byl použit pulzní červený diodový laser (LDH-DC-635, 635 nm, PicoQuant) poskytující 80 ps pulzy s volitelnou, maximálně 40 MHz opakovací frekvencí (repetition rate). Intenzita laseru na vstupu do objektivu byla nastavena dle potřeby mezi 1 až 20 µW. Excitační paprsek byl odražen na dichroickém zrcadle Z473/635 a zaostřen vodním imerzním objektivem (1.2 NA, 60x) (Olympus) do vzorku. Emitované světlo sesbírané tím samým objektivem a prošlé dichroickým zrcadlem bylo zaostřeno na konfokální šterbinu 50 nebo 75 µm v průměru. Signál byl rozdělen (beamsplitter BScube 50/50) a přes filtry (HQ685/50 a BP650-730) propuštěn do detektorů SPAD (lavinové fotodiody; 2 typy: Perkin-Elmer, Fremont, MA; Microphoton Devises, Bolzano, Itálie; při měření byl vždy použit jeden typ). Signál byl z detektorů veden do routeru a dále do čítače pulzů (PicoHarp 300, PicoQuant), kde byl příchod fotonu zaznamenán v TTTR módu. Data byla měřena po

dobu 3, 5 nebo 10 minut. Analýza dat byla prováděna v makru vytvořeném v naší pracovní skupině pod programem Origin (OriginPro7.0, OriginLab Corporation). Korelační křivky byly fitovány na základě Levenberg-Marquardtova algoritmu (nelineární metoda nejmenších čtverců).

FCCS

Nastavení bylo velmi podobné jako při FLCS. Byly použity dva lasery: pulzní červený diodový laser (LDH-DC-635, 635 nm, PicoQuant) a pulzní modrý diodový laser (LDH-P-C-470, 470 nm, PicoQuant) v prokládaném (PIE) módu s celkovou opakovací frekvencí 40 MHz. Dichroické zrcadlo, objektiv i štěrba byly stejné. Signál byl rozdělen na druhém dichroickém zrcadle Z630 a přes filtry HQ685/50 a HQ515/50 propuštěn do detektorů. Typy detektorů i následné vyhodnocení byly stejné.

Antibunching

Nastavení až po detektory bylo stejné jako u FLCS. Signál byl z každého detektoru zvlášť veden přímo do čítače pulzů PicoHarp 300 (mimo router) a zaznamenán v PT2 módu. Byl zaznamenáván čas příchodu fotonů od počátku experimentu s rozlišením 4 ps a bez mrtvé doby mezi detektory. Vzorky byly měřeny po dobu 20 minut. Data byla vyhodnocena v makru v programu Origin.

Rozptyl světla

Fotometr použitý k měření statického i dynamického rozptylu světla (ALV, Langen, Německo) se skládal z He-Ne laseru ($\lambda = 633$ nm), goniometru ALV CGS/8F, detektoru ALV High QE APD a autokorelátoru ALV5000/EPP. Rozptylová měření byla provedena při teplotě 20°C v úhlovém rozmezí 30 – 150°, s roztoky fosfolipidů o koncentraci 0,2 g l⁻¹. Získané intenzity rozptylu a časové autokorelační funkce intenzity byly použity ke stanovení gyračního, resp. hydrodynamického poloměru částic Berryho metodou, resp. metodou kumulantů [28].

3.2 Výsledky

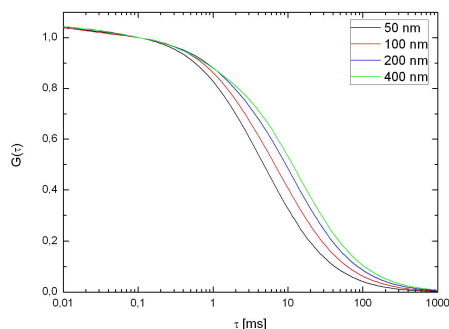
3.2.1 Porovnání velikostí vezikul zjištěných metodami FCS a rozptylem světla

Vezikuly byly připraveny extrudací přes membránu s otvory o velikosti 50, 100, 200 a 400 nm. V dalším textu budou označovány jako vezikuly o průměru „50“, „100“, „200“ a „400“ nm (jejich skutečná velikost se ne vždy rovnala očekávané hodnotě). Vezikuly byly značené Attem633 v poměru 1:1 a 10:1 (barvivo:vezikula). Typ a nastavení přístrojů bylo popsáno v kapitole Experimentální uspořádání.

Měřením vzorků metodou rozptylu světla byl zjištěn hydrodynamický a gyrační poloměr (Tab. 2).

Při použití metody FCS byla proměřena i referenční fluorescenční látka s přesně určeným difúzním koeficientem (Alexa647). Z analýzy autokorelační křivky referenční látky byl určen difúzní čas $\tau_D(ref)$, který byl dosazen do vztahu (16) a tím byl určen efektivní poloměr detekčního objemu r_0 . Fitováním autokorelační křivky barviva ve vezikulách byl získán difúzní čas vezikuly τ_D . Ze znalosti τ_D a r_0 byl podle vztahu (16) spočítán difúzní koeficient značeného lipidového systému. Dosazením hodnoty difúzního koeficientu do vztahu (7) byla stanovena velikost vezikul. Tab. 2 obsahuje zprůměrované hodnoty velikostí vezikul z opakovaných měření. Ze vztahů (7) a (16)

plyne, že difúzní čas τ_D roste přímo úměrně s poloměrem vezikuly. Názorně je to ukázáno na Obr. 10.



Obr. 10 Zobrazené fity normalizovaných korelačních křivek vezikul o různých velikostech.

Tab. 2 Poloměry vezikul získané rozptylem světla a metodou FCS. d je průměr vezikul podle výrobce membrán, $d/2$ poloměr vezikul podle výrobce membrán, τ_D difúzní čas vezikul, r_0 poloměr detekčního objemu, r_H změřený hydrodynamický poloměr vezikul (FCS), R_H změřený hydrodynamický poloměr (DLS), R_G změřený gyrační poloměr.

Vezikuly o průměru „50“ nm byly analyzovány příslušnými metodami pro rozptyl světla, ale ukázaly se jako příliš polydisperzní. U „100“ nm vezikul nebyla zaznamenána chyba měření.

d [nm]	$d/2$ [nm]	τ_D [ms]	r_0 [nm]	r_H [nm]	R_H [nm]	R_G [nm]
50	25	3,76	270	50 ± 3	-	-
100	50	5,09	292	58 ± 5	95	78
200	100	7,78	270	105 ± 7	103 ± 1	100 ± 1
400	200	25,9	360	196 ± 5	219 ± 2	225 ± 1

Analýza dat rozptylu světla (Tab. 2) ukázala, že velikosti vezikul o průměru „200“ i „400“ nm vyšly v poměrně dobré shodě s očekávanými hodnotami. Z dat naměřených na „50“ nm vezikulách nebylo možné určit velikost vezikul kvůli polydisperzitě systému. V několika měřeních se i vezikuly o „100“ nm ukázaly jako velmi polydisperzní. Po provedení analýzy jejich dat se vezikuly ukázaly dvakrát větší. Při měření je kladen velký důraz na čistotu vzorků, při přípravě vzorků byl tedy použit přefiltrovaný pufr pro minimalizaci vlivu prachových částic.

Tab. 2 dále ukazuje, že metoda FCS dává dobré hodnoty pro „100“, „200“ a „400“ nm vezikuly. „50“ nm vezikuly se opakovaně jevily jako 100 nm. Pouze v jednom měření bylo dosaženo hodnoty 80 nm, která se ale také podstatně odchyluje od požadované hodnoty.

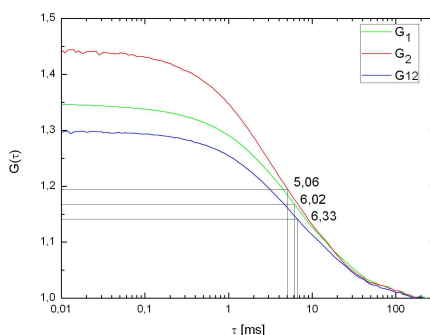
Vytvoření malých vezikul (SUV) je z důvodu větší zakřivenosti energeticky náročnější než vznik velkých vezikul (LUV) [6]. Po přidání vodného prostředí k suchému lipidovému filmu se začnou samovolně tvořit multilamelární vezikuly (MLV), které je třeba protlačením přes membránu s póry „zmenšit na požadovanou velikost“. Při použití membrán s póry o velikosti 50 nm se podle mého názoru MLV rozdělí a zmenší svoji velikost, ale rozpětí velikostí zůstává stále dost široké. Při protlačování membránou může docházet k deformaci (prodlužování) vezikul. Vezikuly jsou tedy protlačeny, ale jejich velikost se nemění.

3.2.2 Určení počtu fluoroforů na vezikulu metodami FCCS, FLCS a antibunchingu

FCCS

Pro experiment byly připraveny vzorky vezikul o velikosti „100“ nm značené červeným a modrým barvivem (Atto633 a D3800) v poměru 1:1:1 a 10:10:1 (tedy např. 1 Atto633 a 1 D3800 na 1 vezikulu). Typ a nastavení přístroje bylo popsáno v kapitole Experimentální uspořádání.

Příklad korelačních křivek je uveden na Obr. 11. Na obrázku je vidět, že došlo ke snížení amplitudy kroskorelační křivky vůči autokorelačním křivkám červeného a zeleného barviva a k posunutí difúzních časů jednotlivých korelačních křivek. Fluorofory jsou nesený na stejném systému (vezikule), difúzní časy by tedy měly být stejné (viz např. následující Obr. 12-14). Snížení amplitudy a rozdíly v difúzních časech jsou důsledkem různé velikosti konfokálních objemů vytvořených dvěma různými lasery [16]. Korigovat tyto artefakty je komplikované, navíc detekční objemy různých barev mohou být kromě rozdílné velikosti i vůči sobě posunuty, což se projeví ve snížené amplitudě a delším difúzním čase kroskorelační funkce. Metoda FCCS tedy není příliš vhodná ke kvantitativnímu určení amplitud auto- a kros- korelačních funkcí a tím i k následnému výpočtu počtu emiterů na vezikule.



Obr. 11 Zobrazení autokorelačních funkcí G_1 a G_2 a kroskorelační funkce G_{12} . Vezikuly byly značeny dvěma barvivem (D3800 a Atto633). Difúzní časy pro G_1 , G_2 a G_{12} jsou různé.

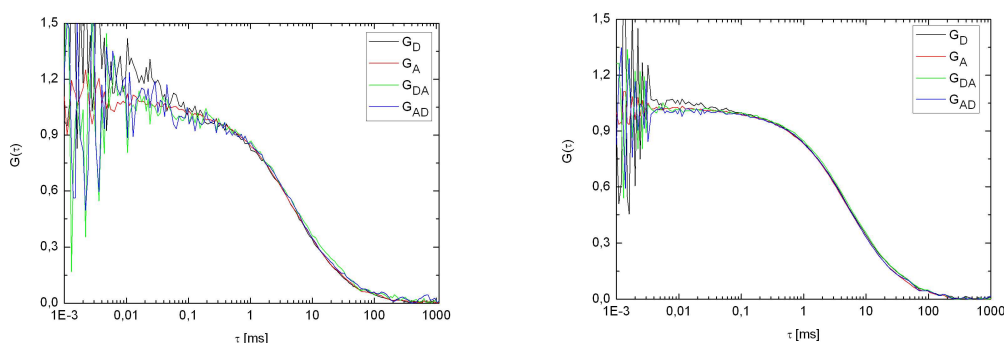
FLCS

Pro měření FLCS byly připraveny vezikuly o velikostech „50“, „100“ a „200“ nm značené jedním červeným barvivem nebo oběma červenými barvivem (Atto633 a DiD) v poměru 1:1, 4:1, 10:1 (barvivo:vezikula) a 1:1:1, 4:4:1, 10:10:1 (např. 1 Atto633 a 1 DiD na 1 vezikulu). Typ a nastavení přístroje bylo popsáno v kapitole Experimentální uspořádání.

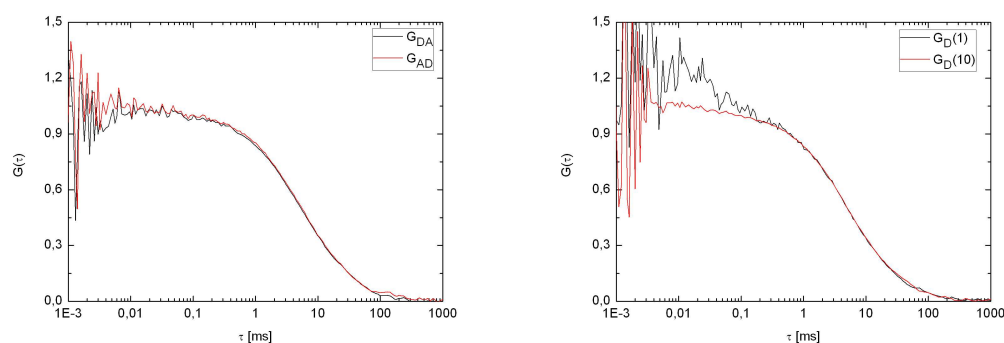
V prvním kroku jsme ověřili tvar a amplitudu korelačních křivek z důvodu kontroly velikosti detekčního objemu pro oba typy barviv. Typické normalizované autokorelační a kroskorelační křivky jsou ukázány na Obr. 12. Červená barviva jsou excitována tím samým laserem, mají totožný detekční objem. V grafu se tato vlastnost projevuje tím, že se jednotlivé křivky v místě poklesu překrývají a že difúzní časy jsou shodné. Kroskorelační křivky zobrazující korelace signálu prvního s druhým barvivem a signálu druhého s prvním barvivem jsou dle předpokladu téměř shodné (Obr. 13).

Na Obr. 12 můžeme dále vidět vliv konformačních (cis-trans) změn barviva DiD na korelační křivku. Při značení vezikul barvivem v poměru 1:1 (barvivo:vezikula), klesá autokorelační křivka v oblasti mikrosekund mnohem rychleji než při vyšším značení (Obr. 14). Při vyšším poměru značení se vliv změny konformace jedné molekuly snižuje, konformační vlivy jednotlivých barviv se navzájem průměrují a

amplituda korelační funkce se pro danou oblast snižuje. Barvivo Atto633 je poměrně stabilní, během jeho vyzařování nedochází k „blikání“.



Obr. 12 Normalizované autokorelační křivky vezikul značených jedním barvivem (G_A – Atto633, G_D – DiD) a normalizované kroskorelační křivky vezikul značených oběma barvivem (G_{AD} , G_{DA}). Značení a) 1:1 a 1:1:1, b) 10:1 a 10:10:1.



Obr. 13 Normalizované kroskorelační křivky vezikul značených dvěma barvivem.

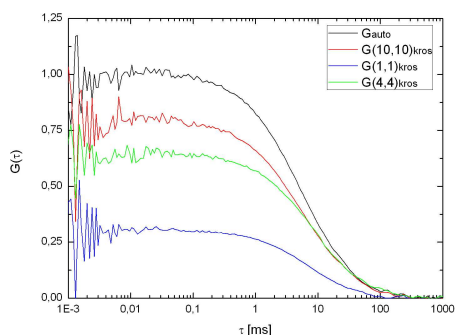
Obr. 14 Normalizované autokorelační křivky pro vezikuly označené barvivem DiD v poměru 1:1 a 10:1 (označeno $G_D(1)$ a $G_D(10)$).

V dalším kroku jsme analyzovali amplitudy auto- a kros- korelačních křivek pro vezikuly značené v různých poměrech. Data získaná měřením FLCS byla vyhodnocena podle vztahů (22) a (23) (Tab. 3). Výstupem FLCS měření je v tomto případě frakce vezikul označených dvěma různými barvivem. Získaná data ukazují, že čím vyšší je průměrný počet fluoroforů na vezikulu, tím vyšší je i amplituda kroskorelace (Obr. 15). V případě, že se v roztoku nevyskytují vezikuly současně značené dvěma různými barvivem, nedochází ke kroskorelaci. Nulová kroskorelace byla ověřena smícháním vezikul značených pouze Attem633 a vezikul značených pouze DiD (viz Obr. 16, kroskorelační křivky náhodně oscilují okolo nuly).

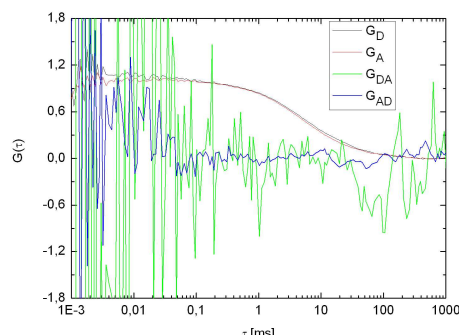
Z Tab. 3 je dále vidět, že frakce vezikul značených dvěma barvivem se mírně liší pro každé barvivo. To je způsobeno rozdílnou celkovou koncentrací barviv ve vzorku. Chyba pramení s největší pravděpodobností z nepřesnosti fotometrického určení koncentrace zásobních roztoků barviv, kdy molární absorpční koeficient pro systém Atto633-DOPE by mohl být různý od hodnoty pro samotnou značku Atto633 udávanou v literatuře.

Vyhodnocením kroskorelačních a autokorelačních funkcí s kvantitativně přesnými amplitudami lze za předpokladu známé distribuce barviva získat údaje o počtu emitterů na vezikulu. Při kvantitativním vyhodnocování dat z FLCS je ale třeba vzít v úvahu, že rozdělení barviv na vezikulách je Poissonovské. V měřeném roztoku se tak vyskytuje

směs vezikul o různém zastoupení fluoroforů. Příspěvek jednotlivých frakcí k měřené celkové korelační funkci je vážen čtvercem svítivosti vezikul, což je dáno počtem a typem fluoroforů na vezikule. Pro přesné kvantitativní vyhodnocení je tedy potřeba započítat vliv Poissonovského rozdělení a vážení příspěvku jednotlivých frakcí, což je nad rámec této bakalářské práce.



Obr. 15 Norm. kroskorelační křivky pro zvyšující se počet barviv na vezikule (G_{kros}). Zvyšování amplitudy je znázorněno vůči autokorelační křivce (G_{auto}).



Obr. 16 Normalizované korelační křivky směsi vezikul značených jedním barvivem.

Tab. 3 Data z FLCS. V prvních dvou sloupcích je zaznamenáno připravované (zamýšlené) množství barviv na vezikule. V dalších sloupcích je poměr průměrného počtu vezikul značených dvěma různými barvivami $\langle N_{AD} \rangle$ ku počtu vezikul značených alespoň jedním barvivem ($\langle N_A \rangle$, $\langle N_D \rangle$).

Připravené značení na jednu vezikulu		$\frac{\langle N_{AD} \rangle}{\langle N_{AD} \rangle + \langle N_A \rangle}$	$\frac{\langle N_{AD} \rangle}{\langle N_{AD} \rangle + \langle N_D \rangle}$
Atto633	DiD		
1	1	0,393	0,334
4	4	0,679	0,664
10	10	0,879	0,746

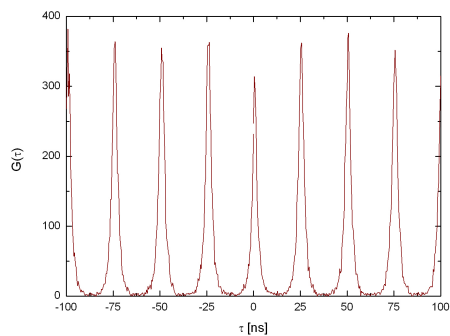
Antibunching

Pro měření antibunchingu byly připraveny vzorky vezikul o velikostech „100“ nm značené Attem633: 1:1, 10:1, DiD: 1:1, 10:1, 4:1 („200“ nm vezikula), oběma barvivami: 10:10:1. Typ a nastavení přístroje bylo popsáno v kapitole Experimentální uspořádání.

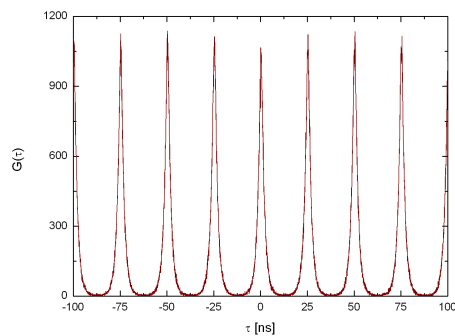
Naměřená data byla vyhodnocena pomocí vztahů (24) a (25), výsledky jsou uvedeny v Tab. 4. Použitím metody antibunchingu byl získán průměrný počet emiterů n na vezikule. Na Obr. 17 je ukázáno charakteristické snížení hodnoty korelační křivky pro $\tau = 0$.

Tab. 4 Výsledky antibunchingu. V prvním sloupci je uvedena velikost vezikuly a typ barviva, ve druhém zamýšlený (připravovaný) počet barviv na vezikulu n_{prep} , ve třetím sloupci je získaný průměrný počet fluoroforů na vezikulu n , ve čtvrtém sloupci je poměr $G(0)/G(\tau_i)$ ukazující míru snížení $G(0)$ vůči $G(\tau_i)$

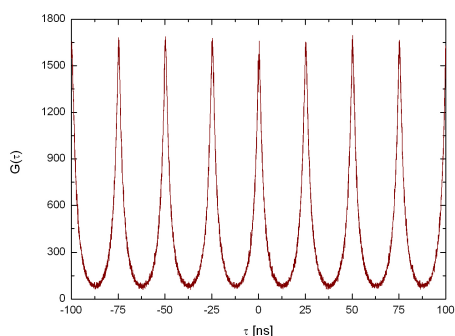
Barvivo, velikost vezikul	n_{prep}	n	$G(0)/G(\tau_i)$
Atto633, 100 nm	1	1,6	0,72
DiD, 100 nm	1	1,8	0,80
DiD, 200 nm	4	4,8	0,88
DiD, 100 nm	10	7	0,96
Atto633, 100 nm	10	12	0,97
DiD+Atto633, 100 nm	20	16	0,98



a)



b)



c)

Obr. 17 Kroskorelační křivky měřené metodou antibunchingu. Pro názornost je kroskorelace druhého s prvním kanálem zobrazena v závislosti na $-\tau$. Kladné hodnoty τ zobrazují kroskorelaci prvního s druhým kanálem. Značení a) 1 barvivo na vezikulu, b) 10 barviv, c) 20 barviv (10 Atto a 10 DiD).

Z Obr. 17 je vidět, že velikost snížení $G(0)$ vůči $G(\tau_i)$ je při konstantní celkové koncentraci vezikul ovlivněna množstvím emitterů ve vezikule (a také celkovou koncentrací difundujících částic). Čím více emitterů ve vezikule, tím menší rozdíl. Velikost snížení byla zaznamenána do Tab. 4 jako poměr $G(0)/G(\tau_i)$.

V Tab. 4 jsou zaznamenány získané hodnoty průměrného počtu fluoroforů na vezikule. Experimentální hodnoty se přibližují k připravovaným. Jak již bylo zmíněno v FLCS analýze, je potřeba vzít v úvahu, že rozdělení fluoroforů na vezikulách je Poissonovské, nelze tedy očekávat, že počet barviv na vezikulách značených např. průměrně jedním barvivem vyjde přesně jedna. Neoznačené vezikuly nejsou pomocí fluorescenčních metod zaznamenatelné. Vícenásobně značené vezikuly navíc přispívají do měření větším počtem fotonů a posunují tak naměřené hodnoty k vyšším číslům. Pro přesné určení počtu fluoroforů je potřeba započítat vliv Poissonovského rozdělení a vážení příspěvku jednotlivých frakcí (což je nad rámec této bakalářské práce).

4 Závěr

V této práci byly porovnány výstupy moderních fluorescenčních metod při charakterizaci fluorescenčně značených lipidových vezikul. Testováním jednotlivých metod při určování velikosti vezikul a při určování průměrného počtu nezávislých emiterů na jedné vezikule jsme dospěli k těmto poznatkům a závěrům:

Při určování velikostí jsme narazili na systematický problém s přípravou. Přestože byl dodržován protokol pro standardní přípravu vezikul, vezikuly o plánovaném průměru 50 nm se opakovaně jevily větší. Obě metody, FCS i rozptyl světla, daly v rámci přesnosti měření správné výsledky pro větší lipidové vezikuly (200 a 400 nm). Metoda FCS ukázala správný výsledek i pro 100 nm vezikuly. Z experimentů plyne, že metoda FCS je vhodná pro stanovování velikostí lipidových vezikul.

Při určování počtu emiterů na vezikulu jsme použili dvě kroskorelační (FCCS, FLCS) a jednu autokorelační metodu (antibunching). FCCS nebyla vhodná k určení počtu emiterů na vezikule, protože detekční objemy vytvořené dvěma různými lasery měly různou velikost a byly vůči sobě mírně posunuty. V metodě FLCS byla obě barviva excitována stejným laserem, detekční objemy byly totožné, z toho důvodu byla FLCS vhodná nejen pro kvalitativní, ale také kvantitativní vyhodnocení dat. Metodou FLCS byla určena frakce vezikul značených oběma barvivy. Metodou antibunchingu byl zjištěn průměrný počet emiterů na vezikulu. Data získaná těmito metodami jsou kvalitativně správná, s vyšším poměrem značení stoupá průměrný počet emiterů na vezikule (antibunching) a zvyšuje se amplituda kroskorelace (FLCS). Pro přesné kvantitativní určení hodnot by bylo nutné získané hodnoty upravit s ohledem na Poissonovské rozdělení barviv na vezikulách. Obě metody, FLCS i antibunching, jsou vhodné pro určení počtu emiterů na vezikule, ale každá má své výhody a nevýhody. Měření antibunchingu je časově náročné (desítky minut), citlivé na poměr signálu k šumu (nutná cca 1 nM koncentrace vezikul, nízké nespecifické pozadí), ale k označení vezikul stačí použít pouze jeden druh barviva. V metodě FLCS je nutné použít dvě barviva s různou dobou života, ale samotné měření trvá jen pár minut.

Ověřili jsme, že FCS je vhodná pro stanovení velikostí lipidových vezikul a že metody FLCS a antibunching jsou vhodné pro stanovení počtu emiterů na vezikule. Dle získaných praktických zkušeností by mělo jít tyto metody aplikovat i na složitější biologické systémy.

5 Seznam použité literatury

- [1] Lakowicz, J.R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers 1999.
- [2] Molecular expressions, 2003. (cit. 2009-05-17)
<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html>
- [3] autoři z Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, katedry biochemie: Biochemie - základní kurz. 3. vyd. Praha, Karolinum 1999.
- [4] Kodíček, M; Karpenko, V.: Biofysikální chemie. 2. přepracované a rozšířené vyd. Praha, Academia 2000.
- [5] Hampl, F.: Biomimetika – organizované vrstvy, liposomy. 2005. (cit. 2009-05-01)
http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2005/6_Hampl.pdf
- [6] Lasic, D.D.: The mechanism of vesicle formation. Biochem. J. 256, 1-11 (1988).
- [7] Uhrová H.: Povrchy, fázová rozhraní, membrány. 2007. (cit. 2009-05-21)
<http://www.vscht.cz/ufmt/cs/pomucky/uhrovah/docs/Biofyzika/Membrany.pdf>
- [8] Wikipedia: Biological membrane. 2007. (cit. 2009-05-23)
http://en.wikipedia.org/wiki/Biological_membrane
- [9] Avanti Polar Lipids, Inc., (cit. 2009-05-19)
<http://www.avantilipids.com>
- [10] Atkins, P.; de Paula, J.: Atkins' Physical Chemistry. 8th Ed. Oxford, Oxford University Press 2006.
- [11] Bartovská, L.; Šišková, M.: Co je co v povrchové a koloidní chemii - výkladový slovník. Praha, vyd. VŠCHT Praha 2005.
- [12] Magde, D.; Elson, E. L.; Webb, W. W.: Thermodynamic fluctuations in a reacting system-measurement by fluorescence correlation spectroscopy. Phys. Rev. Lett. 29, 705-708 (1972).
- [13] Schwille, P.; Haustein, E.: Fluorescence Correlation Spectroscopy, An Introduction to its Concepts and Applications. Biophysics Textbook Online. Germany 2004.
- [14] Beranová, L.; Humpolíčková, J.; Hof, M.: Fluorescenční korelační spektroskopie. Chem. Listy 103, 125–129 (2009).
- [15] Schwille, P.; Meyer-Almes, F.J.; Rigler R.: Dual-Color Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy for Multicomponent Diffusional Analysis in Solution. Biophysical Journal Volume 72, 1878-1886 (1997).
- [16] Weidemann, T.; Wachsmuth, M.; Tewes, M.; Rippe, K.; Langowski, J.: Analysis of Ligand Binding by Two-Colour Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy. Single Mol. 3, 49-61 (2002).
- [17] Kapusta, P.; Wahl, M.; Benda, A.; Hof, M.; Enderlein, J.: Fluorescence lifetime correlation spectroscopy. J Fluoresc 17, 43-48 (2007).
- [18] Benda, A.; Hof, M.; Wahl, M.; Patting, M.; Erdmann, R.; Kapusta, P.: TCSPC upgrade of a confocal FCS microscope. Review of Scientific Instruments 76 (3), (2005).
- [19] Böhmer, M.; Wahl, M.; Rahn, H. J.; Erdmann, R.; Enderlein, J.: Time-resolved fluorescence correlation spectroscopy. Chemical Physics Letters 353, 439-445 (2002).
- [20] Enderlein, J.; Gregor, I.: Using fluorescence lifetime for discriminating detector afterpulsing in fluorescence-correlation spectroscopy. Review of Scientific Instruments 76, (2005).

- [21] Sýkora, J.; Kaiser, K.; Gregor, I.; Bonigk, W.; Schmalzing, G.; Enderlein, J.: Exploring fluorescence antibunching in solution to determine the stoichiometry of molecular complexes. *Analytical Chemistry* 79 (11), 4040-4049 (2007).
- [22] Štěpánek, M.: Pokročilé praktikum z fyzikální chemie. (cit. 2009-05-30)
<http://lynette.natur.cuni.cz/~stepanek/vyuka/praktikum.pdf>
- [23] Procházka, K.: Fyzikální chemie polymerů. Praha, Karolinum 1995.
- [24] Molecular Probes, Inc.; Invitrogen Corporation, 2009. (cit. 2009-05-15)
<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Molecular-Probes.html>
- [25] ATTO-TEC GmbH, 2009. (cit. 2009-05-21)
<http://www.atto-tec.com>
- [26] Mui, B.; Chow, L.; Hope, M. J.: Extrusion technique to generate liposomes of defined sizes. *Methods Enzymol* 367, 3-14 (2003).
- [27] PicoQuant GmbH, MicroTime 200. (cit. 2009-05-01)
http://www.picoquant.com/_products.htm
- [28] Šachl, M.; Uchman, M.; Matějček, P.; Procházka, K.; Štěpánek, M.; Špírková, M.: Preparation and Characterization of Self-Assembled Nanoparticles Formed by Poly(ethylene oxide)-block-poly(ϵ -caprolactone) Copolymers with Long Poly(ϵ -caprolactone) Blocks in Aqueous Solutions. *Langmuir* 23, 3395–3400 (2007).

6 Seznam zkratek a symbolů

a	poloměr sférické částice
A	amplituda
A	atenuátor
APD	lavinová fotodioda
B	druhý viriální koeficient
c	koncentrace rozptylujících částic, popř. koncentrace roztoku
C	koncentrace molekul značených fluorofory (dolní indexy značí typ částic)
d	průměr vezikul podle výrobce membrán
D	difúzní koeficient
$Diff(\tau)$	část korelační funkce popisující difúzní část pohybu
D	detektor rozptýleného světla
DiD	1,1'-dioktadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate
DLS	dynamický rozptyl světla
DOPC	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholin
DOPE	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfoethanolamin
D3800	<i>N</i> -(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza- <i>s</i> -indacene-3-propionyl)-1,2-dihexadekanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfoethanolamin, triethylamoniová sůl
e	Eulerovo číslo (2,71828...)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
f	třetí síla
$F(t)$	intenzita fluorescence v čase t , $F(0)$ intenzita fluorescence v čase $t = 0$
FCS	fluorescenční korelační spektroskopie
FCCS	dvoubarevná fluorescenční kroskorelační spektroskopie
FLCS	časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie
$g(\tau, q)$	autokorelační funkce (DLS)
$G(\tau)$	korelační funkce (dolní indexy popisují, pro jaké látky byla funkce počítána)
$G_{diffusion}(\tau)$	korelační funkce popisující difúzi
$G_{total}(\tau)$	výsledná korelační funkce ($G_{diffusion}(\tau) \cdot G_{triplet}(\tau)$)
$G_{triplet}(\tau)$	korelační funkce popisující přechod do tripletového stavu
G (bez indexu)	goniometr
G_i	korelační funkce (FCS) pro látku i (používáno v popiscích grafů), G_{auto} a G_{kros} značí auto- a kros. korelační křivky, případné číslo v závorce udává počet emitterů na vezikule
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
$i(t, q)$	okamžitá časová hodnota intenzity rozptýleného záření
$I_{ex}(r)$	intenzita excitačního světla
I_{max}	maximální hodnota intenzity excitačního světla $I_{ex}(r)$
I_0	intenzita primárního paprsku
$I(\theta)$	intenzita rozptýleného záření
J	tok látky
k	počet událostí, které sledujeme
k_B	Boltzmannova konstanta ($1,38065 \cdot 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2} \text{ K}^{-1}$)
K	rozptylová konstanta
LUV	velké unilamelární vezikuly

m_i	hmotnost elementu
M	molární hmotnost
M	měrná celá
MLV	multilamelární vezikuly
n	počet nezávislých emiterů na molekule (určený experimentálně)
n_{prep}	připravovaný počet barviv na vezikulu
n_{roztok} ; n_{rozp}	indexy lomu roztoku; čistého rozpouštědla
N	průměrný počet částic v detekčním objemu (dolní indexy značí typ částic)
$P(\theta)$	rozptylová funkce
PN	parametr získaný z fitu (počet částic v detekčním objemu)
\mathbf{q}	rozptylový vektor
Q	kvantový výtěžek
r	poloha v prostoru
r_{det}	vzdálenost rozptylující částice od detektoru
r_i	vzdálenost elementu od těžiště
r_H	hydrodynamický poloměr
r_0	poloměr detekčního objemu V_{eff}
R_G	gyrační poloměr vezikuly
R_H	hydrodynamický poloměr molekuly (DLS)
$R(\theta)$	Rayleighův poměr ($\Delta R(\theta, c)$ - přírůstek Rayleighova rozptylu; R , R_0 a ΔR příspěvek roztoku, čistého rozpouštědla a rozpuštěných částic k celkovému rozptylu)
R	referenční detektor
S	plocha koule
SUV	malé unilamelární vezikuly
S_1	první excitovaný stav (singlet)
S_2	vyšší excitovaný stav (singlet)
t	čas
t_{celk}	doba, po kterou byl signál sbírán
T	teplota
\overline{T}	frakce molekul v tripletovém stavu
T_c	teplota fázového přechodu
TCSPC	časově korelované čítání fotonů
TR1, TR2	parametry získané z fitu (frakce částic podstupující různé fotofyzikální jevy)
TTTR mode	time-tagged time-resolved mód
T_1	tripletový stav
V	objem
V_{eff}	detekční (efektivní) objem
$W(r)$	prostorové rozložení emitovaného světla
x	x -ová souřadnice polohy v detekčním objemu V_{eff}
y	y -ová souřadnice polohy v detekčním objemu V_{eff}
z	z -ová souřadnice polohy v detekčním objemu V_{eff}
z_0	poloviční výška detekčního objemu V_{eff}
Z	zdroj světla
α	polarizovatelnost
β	koherenční faktor
γ	střední hodnota Poissonova rozdělení
δX	fluktuace veličiny X , změna veličina X

ε	molární absorpční koeficient
η	viskozitní koeficient
θ	úhel mezi rozptýleným a primárním paprskem
κ	účinnost detekce
λ	vlnová délka rozptýleného záření
λ_{abs}	vlnová délka maxima absorpce
λ_{fl}	vlnová délka maxima fluorescenční emise
μ	počet detekovaných fotonů na molekulu za sekundu (svítivost)
π	Ludolfovo číslo (3,14159...)
σ	účinný průřez absorpce světla
τ	čas mezi dvěma měřeními, mezi nimiž se zjišťuje souvislost (delay time)
$\tau_{cis/trans}$	čas popisující změnu konformace
τ_D	difúzní čas
τ_i	čas, kdy se molekula ještě vyskytuje v detekčním objemu ($\tau_i < \tau_D$)
$\tau_{lifetime}$	doba života fluoroforu
$\tau_{triplet}$	čas popisující relaxaci singlet-triplet systému
$\langle X \rangle$	zprůměrovaná hodnota veličiny X